

ANÁLISIS DE FRECUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS *Ile-58Thr* y *Ala-9Val* EN EL GEN *MnSOD*, *Ala-73Thr* EN EL GEN *CST3* y *Ala-224Val* EN EL GEN *CTSD* y SU ASOCIACIÓN CON LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER EN PACIENTES DEL HOSPITAL ANDRADE MARÍN EN ECUADOR

Carla Rodríguez Proaño¹, Marcos Serrano³, César Paz-y-Miño², Paola Párraga¹ &

Marcelo Grijalva¹.

¹ Escuela Politécnica del Ejército. Ingeniería en Biotecnología. Av. El Progreso, Sangolquí. geovanna71@hotmail.com

² Instituto de Investigaciones Biomédicas. Universidad de las Américas. Av. Granados E12-14 y Colimes esq., Quito.

iib-udla@udla.edu.ec

³ Servicio de Neurología, Hospital de la Seguridad Social "Carlos Andrade Marín". Quito.

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad progresiva irreversible del cerebro, de patogenia compleja. La enfermedad se caracteriza desde el punto de vista anatómico, por pérdida de neuronas y sinapsis, presencia de placas seniles, ovillos neurofibrilares y de degeneración neurofibrilar. En este estudio, se analizaron las frecuencias de los polimorfismos de *Ala-73Thr* (G>A) en el gen CST3 y *Ala-224Val* (C>T) en el gen CTSD mediante PCR-RFLP e *Ile-58Thr* (T>C) y *Ala-9Val* (T>C) en el gen MnSOD mediante secuenciación automática, y su asociación con la enfermedad de Alzheimer en pacientes del Hospital Andrade Marín (HCAM) en Ecuador. Se analizaron muestras de sangre de 56 individuos afectados de EA del Servicio de Neurología del HCAM y 55 individuos controles asintomáticos. Los resultados de los genotipos obtenidos mediante la técnica PCR-RFLP y secuenciación automática fueron analizados con el programa SSPS v.17. El polimorfismo (T>C) de *Ile-58Thr* no presentó relación con la enfermedad ya que no se encontraron variantes polimórficas. Al realizar el cálculo de Hardy Weinberg y el análisis de Chi-cuadrado se mostró que al comparar la población afecta con los controles para *Ala-73Thr* (G>A) existieron diferencias estadísticamente significativas y adicionalmente que esta población no estaba en equilibrio. Para *Ala-9Val* (T>C) no existieron diferencias estadísticas significativas y la población mostraba equilibrio. Estas dos variantes no mostraron relación con la enfermedad, lo que fue comprobado también con el análisis de *Odds ratio*. Por otro lado, el polimorfismo *Ala-224Val* (C>T) mostró ser importante en los tres análisis; el homocigoto raro TT presentó un valor significativo OR de 9, es decir, que un portador que posea el genotipo TT tiene 9 veces más riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer que un portador homocigoto CC normal.

Palabras clave: polimorfismos genéticos, enfermedad de Alzheimer, PCR-RFLP, secuenciación capilar.

ABSTRACT

Alzheimer's disease is a progressive irreversible brain illness of complex pathogenesis which is sometimes hereditary. From the anatomical point of view, its findings include loss of neurons and synapses, presence of senile plaques, neurofibrillar tangles and neurofibrillar degeneration. In this study, we analyzed the frequencies of the Ala-73Thr polymorphisms (G>A) in the CST3 gene and Ala-224Val (C>T) in the CTSD gene by PCR-RFLP and Ile-58Thr (T>C) and Ala-9Val (T>C) in the MnSOD gene by capillary sequencing. The association of the above variants with Alzheimer's disease in patients from the Carlos Andrade Marín Hospital (HCAM) in Ecuador was then studied. Blood samples were obtained from 56 affected individuals from the Neurology Department of HCAM, and 55 control subjects. The results of genotypes obtained by PCR-RFLP and capillary sequencing were analyzed by using the SSPS v. 17. Polymorphism (T>C) of Ile-58Thr has no relationship with the disease since no polymorphic variant was found. After calculating the Hardy Weinberg and Chi-square analysis it was showed that, when comparing the frequency of Ala-73Thr (G>A) in the affected population versus the control group, there was a statistically significant difference while no equilibrium was demonstrated. For Ala-9Val (T>C), there were no statistically significant differences and the population was in equilibrium. These two variations were unrelated to the disease, which was also found in the *Odds* ratio analysis. In contrast, Ala-224Val polymorphism (C>T) was shown to be important in the three analyses; rare homozygote TT showed a significant value of OR with 9, it means, when a carrier has the genotype TT, it has 9 times higher risk of developing Alzheimer's disease than the homozygous CC normal carrier.

Key words: Genetic polymorphisms, Alzheimer's disease, PCR-RFLP, capillary sequencing.

INTRODUCCIÓN

Alzheimer es una enfermedad progresiva e irreversible del cerebro, de patogenia compleja, a veces hereditaria, que se caracteriza desde el punto de vista anatómico, por pérdida de neuronas, presencia de placas seniles, ovillos neurofibrilares y degeneración neurofibrilar¹. Los ovillos neurofibrilares son complementos de la proteína microtubular TAU. Estos se pueden observar mediante microscopía electrónica y tienen forma de filamentos helicoidales pareados. Las placas seniles o neuríticas están constituidas por la sustancia β -amiloide resultado de una acumulación de varias proteínas en una reacción inflamatoria². Gran parte de los casos estudiados son esporádicos y un 5% tiene un patrón de herencia autosómica dominante³.

Se considera que la enfermedad de Alzheimer interviene del 60% al 70% en los casos de deterioro cognitivo en ancianos, tiene un grado de afectación del 10% en individuos mayores a 65 años y un 40% para ancianos mayores a los 85 años⁴. Mundialmente, casi 35.6 millones de personas padecen esta demencia. Se espera que para el año 2030 se incremente este valor a 65.7 millones y se triplique para el año 2050⁵. Se reportan 7.7 millones de casos de demencia cada año, determinando un nuevo caso en cualquier parte del mundo cada 4 segundos⁶. La enfermedad de Alzheimer causa morbilidad y mortalidad prematura en casi 2 de cada 3 individuos durante su vida⁷.

En el Ecuador, según el INEC, en el año 2007 el total de defunciones fue de 58,016 personas de las cuales 161 individuos fallecieron de demencia y enfermedad de Alzheimer lo que corresponde al 0.27%. En el año 2008 el número de fallecidos fue de 60,023; 177 fallecieron por esta causa correspondiendo al 0.29%. En el año 2010 incrementó el total de fallecidos a 61,681 por lo tanto existe un incremento en la mortalidad general y mortalidad por demencia y enfermedad de Alzheimer.

Gracias al desarrollo de la genética molecular se han podido realizar estudios sobre las enfermedades neurodegenerativas, lo que ha permitido entender las bases genéticas de estos procesos para poder encontrar, con más investigación, un mejor tratamiento o cura para estas afecciones. Uno de los factores genéticos que podría influir en el desarrollo de la enfermedad es el gen MnSOD, que proviene de la familia hierro/manganeso superóxido dismutasa y codifica una proteína por el ADN nuclear pero su actividad biológica está localizada en

la mitocondria hacia donde es transportada mediante un proceso de traslación⁸. Esta enzima convierte los radicales superóxido (ROS) en oxígeno molecular y H₂O₂, el mismo que puede ser luego neutralizado por la glutatión peroxidasa, peroxiredoxin reductasa y catalasa, además se une a los subproductos de superóxido de la fosforilación oxidativa y los convierte en peróxido de hidrógeno y oxígeno diatómico. Las mutaciones de este gen se han asociado con miocardiopatía idiopática (IDC), envejecimiento prematuro, enfermedades esporádicas de las neuronas motoras y el cáncer⁹.

Según evidencias mostradas anteriormente, MnSOD sugiere ser crítico para que las neuronas sobrevivan al daño oxidativo¹⁰. Ya que SOD juega un papel importante entre las enzimas antioxidantes, protege al cerebro contra ROS y si es que existe un cambio en la actividad de esta enzima en la mitocondria, existirán disfunciones en los mecanismos de los cuales es responsable¹¹.

Por otro lado, la cistatina es una familia de proteínas, conformada por tres grupos: cistatinas tipo 1 y 2 y los quinínógenos. Las proteínas cistatinas de tipo 2 son una clase de inhibidores de la proteasa cisteína, encontrada en fluidos y secreciones donde parece tener funciones protectoras. El gen CST3 se encuentra en el locus cistatina del cromosoma 20 y codifica la mayor parte de inhibidores extracelulares de las proteasas cisteínas. Una mutación en este gen ha sido relacionada con angiopatía amiloide. La expresión de esta proteína en las células vasculares del músculo liso de las paredes es muy reducida en lesiones ateroscleróticas y aneurisma aórtico, estableciendo su rol en la enfermedad vascular¹².

La aspartil proteasa lisosomal catepsina D está implicada en la patogénesis de varias enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson y Creutzfeldt-Jakob¹³. La catepsina D es una proteasa ácida intracelular que tiene relación con el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, ya que genera fragmentos de beta-amiloide (A β) a partir de la división de la proteína precursora amiloide APP y la degradación de la proteína TAU en varios fragmentos¹⁴.

La variante *Ile58Thr* afecta la estabilidad de la interface de la proteína tetramérica y reduce la actividad biológica de MnSOD. En este polimorfismo se sustituye T \rightarrow C (dbSNP ID = rs7855) provocando un cambio de una Isoleucina por una Treonina, en el codón 58 del exón 6 en la región 6q25¹⁵. A su vez, el

polimorfismo *Ala-9Val* es el producto de una sustitución de T → C (dsSNP ID = rs4880) en el codón 9 del exón 2 en la región 6q25, produciendo un cambio de Valina a Alanina. Esta sustitución induce cambios de conformación en la secuencia mitocondrial de orientación (MTS) de la estructura hojas plegadas β a hélice-α y debido a esto no se puede realizar correctamente el transporte hacia la mitocondria¹⁶.

Ya que la cistatina C es un inhibidor de la proteasa cisteína lisosomal interviene en el envejecimiento neuronal o en la muerte celular de la enfermedad de Alzheimer. El polimorfismo que causa este proceso corresponde al gen CST3 localizado en la posición 73 del exón 1, resultando en un cambio de G → A (ds SNP ID = rs1064039), lo que lleva a una sustitución de Alanina por Treonina¹⁷.

El gen CTSD se encuentra en el cromosoma 11 en la región 15.5 y el polimorfismo *Ala-224Val* se ubica en el exón 2 en la posición 224. Este resulta en un cambio de C → T (ds SNP ID = rs17571), que consiste en una sustitución de un residuo de Alanina por Valina. Este polimorfismo causa un aumento de la secreción pro-CTSD y la maduración intracelular¹⁸.

El objetivo de este trabajo fue analizar las frecuencias polimórficas de *Ala-73Thr* en el gen CST3 y *Ala-224Val* en el gen CTSD mediante PCR-RFLP e *Ile-58Thr* y *Ala-9Val* en el gen MnSOD mediante secuenciación, para determinar su asociación con la enfermedad de Alzheimer en pacientes del Hospital Andrade Marín en Ecuador.

MATERIALES Y MÉTODOS

En este estudio caso control retrospectivo se utilizaron muestras de sangre periférica de pacientes con posible diagnóstico de Alzheimer. Los controles utilizados forman parte del banco de ADN del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UDLA. Se analizaron 55 casos controles y 56 casos afectos. En ambos grupos se contó con información de edad, sexo, un historial clínico con su consentimiento informado y el grupo de individuos afectos contó con el diagnóstico confirmado de la enfermedad de Alzheimer. Este estudio fue aprobado por el comité de Bioética de la UDLA. En ambos grupos se contó con información de edad, sexo, un historial clínico con su consentimiento informado y el grupo de individuos afectos contó con el diagnóstico confirmado de la enfermedad de Alzheimer¹⁹.

Genotipaje

La extracción de ADN se realizó a partir de muestras de sangre periférica mediante el kit Pure Link™ Genomic DNA Mini de Invitrogen seguida de la cuantificación utilizando el Qubit® dsDNA HS Assay Kit.

En cuanto al polimorfismo *Ile-58Thr* del gen MnSOD se amplificó un fragmento de 264 pares de bases (pb), los primers utilizados fueron FW: 5'-TCCAGGGGAAGTACTGTTTG-3' y RV: 5'-GCAGACCTCTTTGATGGTTG-3'. Con respecto al polimorfismo *Ala-9Val* del gen MnSOD se amplificó un fragmento de 217pb con la utilización de los primers FW: 5'-GCTGTGCTTTCTCGTCTTCA-3' y RV: 5'-CAACGCCTCTGGTACTTCT-3'. Para el gen CST3 se obtuvo un fragmento de 262pb, los primers utilizados fueron FW: 5'-TATCTAGCTCCAGCCTCTCG-3' y RV: 5'-TACATGTCGTTGCTGGCTTT-3'. Por último, para el gen CTSD se amplificó un fragmento de 303pb con la utilización de los primers FW: 5'-GTCCATGTAGTTCTTGAGCA-3' y RV: 5'-GGTGACCACTTCTTAGGACT-3'. Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen de 50µL, para cada polimorfismo se utilizó una variación de entre 0.5-2.5mM de Mg⁺⁺, las concentraciones de dNTPs fueron de entre 0.1-0.3mM, la concentración de primer fue de 0.2mM excepto en el polimorfismo del gen CTSD en el cual se utilizó 0.4mM de primer FW y RV; se utilizó 2.5U de Platinum® Taq ADN polimerasa de Invitrogen, 1X de PCR buffer 10X y se aforó con H₂O MiliQ.

El programa de amplificación para los polimorfismos *Ile-58Thr* y *Ala-9Val* del gen MnSOD consistió en 10 min de desnaturalización a 95°C, 45 segundos de desnaturalización a 95°C, 1 min de anillamiento a 60.3 y 62°C, respectivamente, 45 segundos de elongación a 72°C por 35 ciclos y 3 min de elongación final a 72°C.

Para el gen CST3 el programa de amplificación consistió en 10 min de desnaturalización a 95°C, 30 segundos de desnaturalización a 95°C, 30 segundos de anillamiento a 53°C, 45 segundos de elongación a 72°C por 35 ciclos y 3 min de elongación final a 72°C. Por último, para el gen CTSD programa consistió en 10 min de desnaturalización a 95°C, 30 segundos de desnaturalización a 95°C, 45 segundos de anillamiento a 60°C, 45 segundos de elongación a 72°C por 35 ciclos y 3 min de elongación final a 72°C. La verificación de los ampliconesse realizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% y se los observó en un transiluminador UV.

Para el análisis de los polimorfismos de los genes CST3 y CTSD se utilizó la técnica PCR-RFLP. Las enzimas de restricción utilizadas para digerir los fragmentos fueron *EagI* y *Acil* (New England Biolabs) respectivamente. A 30µL de producto de PCR se agregó 0.4µL de Enzima (10,000 U/mL), 5µL de NEBuffer 10X y 14.6µL de H₂O MiliQ dando así un volumen final de 50µL. Se incubó por 3 horas a 37°C.

Los fragmentos obtenidos a partir de la PCR de los polimorfismos del gen MnSOD se los secuenció con la utilización de BigDye® Terminator v3.1 y v1.1 Cycle Sequencing Kit de Applied Biosystems™ para el polimorfismo *Ile-58Thr* y *Ala-9Val* respectivamente en el analizador genético 3130 de Applied Biosystems. Los resultados de los diferentes genotipos para *Ile-58Thr*, se los puede observar en la figura 1; para *Ala-9Val* en la figura 2 y figura 3.

Los fragmentos, de acuerdo al genotipo, de los individuos analizados luego de la digestión con enzimas de restricción del gen CST3 se muestran en la figura 4: Ala/Ala = 132pb y 130pb, Val/Val = 262pb y Ala/Val = 262pb, 132pb y 130pb; y los productos de la digestión del gen CSTD fueron la/Ala = 76pb y 77pb, Val/Val = 153pb y Ala/Val = 153pb, 77pb y 76pb (figura 5). La determinación de los fragmentos se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 4% y revelados en un transiluminador UV.

Análisis estadístico

Se empleó un análisis estadístico de tipo descriptivo que incluye el cálculo de frecuencias alélicas de los polimorfismos estudiados, tanto en los genotipos de los individuos controles y afectados, y se realizó el cálculo de la frecuencia de Hardy-Weinberg. Para establecer si existen diferencias significativas entre los dos grupos y los polimorfismos estudiados se realizó la prueba chi-cuadrado de Pearson con un grado de libertad y la prueba de Odds Ratio con una tabla de contingencia (2x2) para determinar el riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer en presencia de los polimorfismos en los grupos estudiados mediante el programa SPSS v.17 (SPSS, Chicago, Illinois).

RESULTADOS

En la *tabla 1* se agrupó los resultados de los genotipos observados, mostrando la distribución total de la población en estudio. En cuanto al polimorfismo CST3 (Ala-73Val) (G>A), se puede constatar que el mayor porcentaje de individuos poseen el alelo normal G. De igual manera en el polimorfismo CTSD (Ala-224Val) (C>T) existe un mayor porcentaje del alelo C normal en la población. Por su parte, en el polimorfismo MnSOD (Ile-58Thr) (T>C) se encontró solamente el alelo G normal en toda la población, por lo que no se realizó ningún cálculo estadístico adicional. Finalmente, los datos obtenidos para el polimorfismo MnSOD (Ala-9Val) (T>C) revelan al alelo C raro con un mayor porcentaje que el normal en la población.

En la *tabla 2* se muestra el análisis de Hardy-Weingberg, se describe la distribución de las frecuencias fenotípicas y alélicas. Para el polimorfismo *Ala-9Val* se pudo observar en la población afecta 13 individuos homocigotos normales (T/T), 24 individuos heterocigotos (T/C) y 19 individuos homocigotos raros (C/C). Por otro lado, en el grupo control se determinó 8 individuos homocigotos normales (T/T), 26 individuos heterocigotos (T/C) y 21 individuos homocigotos raros (C/C). Respecto a la frecuencia del alelo T, para el grupo afectos fue de 0.45 y para el grupo control fue de 0.38, mientras que la frecuencia del alelo C en grupo afectos fue de 0.55 y en el grupo control fue de 0.62. Al realizar el análisis de chi cuadrado para cada población se estableció que los dos grupos están en equilibrio de Hardy-Weinberg y no existen diferencias significativas en cada uno de ellos. En el grupo de individuos afectos del gen CST3 se encontró 42 individuos homocigotos normales (G/G), 6 individuos heterocigotos (G/A) y 8 individuos homocigotos raros (A/A). Por otro lado, en el grupo control se determinó 48 individuos homocigotos normales (G/G), 3 individuos heterocigotos (G/A) y 4 individuos homocigotos raros (A/A). Respecto a la frecuencia del alelo G, para el grupo afectos fue de 0.8 y para el grupo control fue de 0.9, mientras que la frecuencia del alelo A en grupo afectos fue de 0.2 y en el grupo control fue de 0.1. Al realizar el análisis de chi cuadrado para cada población se estableció que los dos grupos no están en equilibrio Hardy-Weinberg y existen diferencias significativas en cada uno de ellos. En cambio, para el gen CTSD, en la población de grupo afectos se encontró 20 individuos homocigotos normales (C/C), 32 individuos heterocigotos (C/T) y 4 individuos homocigotos raros (T/T). Por otro lado, en el grupo

control se determinó 45 individuos homocigotos normales (C/C), 9 individuos heterocigotos (C/T) y 1 individuo homocigoto raro (T/T). Respecto a la frecuencia del alelo C, para el grupo afectos fue de 0.64 y para el grupo control fue de 0.9, mientras que la frecuencia del alelo T en grupo afectos fue de 0.36 y en el grupo control fue de 0.1. Al realizar el análisis de chi cuadrado para cada población se estableció que los dos grupos están en equilibrio Hardy-Weinberg y no existen diferencias significativas en cada uno de ellos.

De igual manera se realizó una congruencia de datos de los dos grupos de cada polimorfismo, para determinar la asociación que tienen las variantes genéticas en cada gen y establecer su nivel de significancia. El polimorfismo G73A del gen CST3 presenta un valor de X^2 de 51.27** ($p < 0.0001$). Por su parte, MnSOD T9C obtuvo un valor de X^2 de 0.57 con ($p > 0.45$) y CTSD C224T mostro un valor de X^2 de 0.21 con ($p > 0.65$), los cuales no indican significancia pero indican una relevancia entre el grupo afecto con el grupo control mostrada en la *tabla 3*.

Y por último, mediante la prueba de Odds ratio, que se describe en la *tabla 4*, se logró determinar que genotipo o alelo específico genera un riesgo relativo en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, además se observan los resultados de los diferentes polimorfismos con sus riesgos relativos respectivos. Los polimorfismos de MnSOD T9C y CST3 G73A no presentan un valor relevante de Odds ratio, sin embargo CTSD C224T presenta un valor relevante para el heterocigoto C/T y para el grupo conformado por el heterocigoto y homocigoto raro C/T + T/T, esto quiere decir que un individuo que presente el alelo T tendrá 8.1 veces más riesgo en desarrollar la enfermedad de Alzheimer que uno normal.

DISCUSIÓN

Mundialmente, el desorden neurodegenerativo, enfermedad de Alzheimer, cada vez tiene mayor prevalencia en poblaciones ancianas, debido a que las personas viven más tiempo y el envejecer se convierte en un factor de riesgo mayor y las cifras de incidencia se incrementan cada vez más²⁰.

Esta enfermedad está caracterizada por demencia, pérdida de memoria progresiva, acumulación de placas de amiloide y formación de ovillos neurofibrilares en el encéfalo, principalmente en la corteza cerebral y el hipocampo. La formación de los ovillos neurofibrilares y las placas generan una pérdida neuronal progresiva y la muerte se produce alrededor de los 7 a 10 años desde el inicio de los síntomas de la enfermedad. Además, se ha visto que la enfermedad de Alzheimer es un trastorno genéticamente heterogéneo ya que esta enfermedad tiene un patrón de herencia multifactorial, depende de interacciones complejas entre varios factores genéticos y ambientales⁴. La agregación y acumulación de la proteína beta-amiloide (A β) en el cerebro, puede deberse a una mayor producción neuronal de (A β), la disminución de la actividad de las enzimas degradantes de (A β) o alteraciones en los procesos de transporte que circula (A β) a través de la barrera sangre-cerebro. Los oligómeros (A β) afectan las funciones sinápticas, mientras que las placas amiloides fibrilares desplazan y distorsionan los procesos neuronales. De igual manera estos oligómeros interactúan con las membranas y receptores de la superficie celular, alterando las cascadas de transducción de señales, cambiando las actividades neuronales y activando la liberación de mediadores neurotóxicos por la microglia (células inmunes residentes). Las proteínas Tau y α -sinucleína pueden auto-ensamblarse para formar oligómeros de patógenos y así formar grandes agregados intraneuronales, desplazando organelos vitales intracelulares²⁰.

Así, la superóxido dismutasa (SOD) es una importante enzima antioxidante que interviene en la desintoxicación de los radicales superóxidos²¹. El daño de los radicales de oxígeno libres puede afectar a neuronas a través de la vía de peroxidación lipídica del ADN mitocondrial, la cadena respiratoria y la proteína de reticulación de los neurofilamentos. De igual manera se ha encontrado relaciones del polimorfismo *Ala-9Val* del gen SOD2 en desordenes neurodegenerativos; así como del polimorfismo *Ile-58Thr*, debido a que desestabiliza la interface tetramérica de MnSOD y reduce su actividad enzimática. Además de posibles

relaciones con enfermedades neurodegenerativas, este estudio lo relacionó con neuropatía diabética en la diabetes mellitus tipo 1, en el cual encontró únicamente asociación con el polimorfismo *Ala-9Val* con la enfermedad. Estudios realizados en la enfermedad de Parkinson²² y en desordenes depresivos¹⁰, muestran posibles asociaciones con la variante *Ala-9Val* y ninguna asociación con *Ile-58Thr*. Este polimorfismo se ha encontrado menos del 1% en toda la población y en el estudio de desordenes depresivos no se observó en ninguno de sus pacientes. En el presente trabajo, para *Ile-58Thr* no se observó el genotipo homocigoto raro CC en ninguno de los grupos en estudio, por lo cual no se realizó ningún análisis estadístico y este no presenta ninguna relación con la enfermedad de Alzheimer. El polimorfismo *Ala-9Val* tiene una frecuencia del alelo C raro de 0.62 en la población control mayor que en la población afecta con 0.55, siguiendo el equilibrio Hardy-Weinberg en los dos grupos; y al obtener los valores de OR se determinó que esta variante no presenta asociación con la enfermedad de Alzheimer debido a que los resultados fueron no significativos.

Al realizar el análisis del polimorfismo *Ala-73Val* del gen CST3 en un estudio de la población italiana²³, no encontró una asociación significativa entre la variante y la enfermedad de Alzheimer, así mismo no se encontró diferencias estadísticas de las frecuencias alélicas en los dos grupos estudiados. En otros estudios se ha observado que el gen CST3 que contiene este polimorfismo ha sido asociado con un elevado riesgo a la susceptibilidad para la enfermedad de Alzheimer en poblaciones caucásicas. Sin embargo, al igual que en el estudio de población italiana, los resultados no muestran incidencia con el desarrollo de la enfermedad en Japón²⁴, Alemania²⁵ y Holanda²⁶. En este estudio se pudo observar que tanto en individuos afectos y controles, existe una mayor frecuencia del genotipo normal GG. Al realizar el cálculo de la frecuencia de Hardy-Weinberg se estableció que estos grupos no se encontraban en equilibrio, esto puede deberse a que existen más genotipos normales que raros, por lo que se obtienen esos resultados. De igual manera, al analizar el riesgo de esta variante se obtuvieron valores no significativos, quiere decir que este polimorfismo no posee un riesgo en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, por lo que concuerda con los resultados que presentaron en otros estudios.

En individuos que han fallecido por la enfermedad de Alzheimer se ha visto que poseen una gran acumulación de placas seniles, que están conformadas por la proteína β -amiloide. Genes como CTSD que sintetiza la proteína catepsina D, la cual interviene en la síntesis de $A\beta$, depósito y eliminación. Esta proteína se ha visto implicada en el proceso de degradación de APP y la proteína TAU. Por esta razón puede ser que los polimorfismos generados en CTSD intervengan en la acumulación de la proteína TAU y ovillos neurofibrilares, generando así la enfermedad de Alzheimer¹⁸. En una publicación sobre demencia vascular, determinaron que el polimorfismo del gen CTSD no tenía relación con la enfermedad en la población coreana, a diferencia de otros estudios realizados en poblaciones alemanas ($P = 0.009$)¹², británicas ($P < 0.001$)¹³ o americanas ($P < 0.001$)²⁷. En el 2006 se sugirió, que la variante polimórfica *Ala-224Val* del gen CTSD incrementa el riesgo relativo en la enfermedad de Alzheimer¹⁸. En este estudio caso-control realizado en la población ecuatoriana, se estableció con el análisis de Hardy-Weinberg que los grupos se encontraban en equilibrio. De los datos obtenidos el genotipo heterocigoto C/T es más común en la población de individuos afectados que en controles. Siguiendo el patrón de análisis estadísticos, al determinar el riesgo relativo del genotipo heterocigoto C/T fue altamente significativo, con un OR de 8 (IC = 3.2 - 19.8). Para el genotipo homocigoto raro T/T, se obtuvieron resultados significativos, con un OR de 9 (IC = 0.9 - 85.7) en los grupos analizados. El mismo análisis se realizó conjuntamente con los genotipos heterocigoto C/T y homocigoto raro T/T, obteniendo un OR de 8.1 (IC = 3.4 - 19.5) altamente significativo ($p < 0.0001$); sugiriendo que personas que posean el alelo T tendrán 8.1 veces más riesgo en desarrollar la enfermedad de Alzheimer que una normal. Por lo que esta variante polimórfica puede desempeñar un importante rol biológico en la patogenia de la enfermedad de Alzheimer.

Debido al impacto que tiene en la sociedad es muy importante la investigación que se realiza para determinar la etiopatogenia, diagnóstico y tratamiento de la EA. Estos resultados podrán ser de gran ayuda para futuras investigaciones y esta investigación permitirá obtener un mayor entendimiento de la genética de la enfermedad de Alzheimer y las posibles interacciones entre los diferentes factores de la patogenia de la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA. (1990). Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid-b protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science*, 250: 279-282
2. Segovia de Arana J.M., Mora T. *Enfermedades Neurodegenerativas*. Serie Científica. Pp. 9, 11, 12. Recuperado Junio del 2012 en <http://www.imsersomayores.csic.es/documentos/documentos/segovia-neurodegenerativas-01.pdf>
3. Guimerá A, Girones X, Cruz-Sanchez F. (2002). Actualización sobre la patología de la enfermedad de Alzheimer. *Rev Esp Patol*, Vol.35. 1: 21-48
4. Jorde L, Carey J, Bamshad M, White R. (2008). *Genética Médica* (pág. 272, 273). España: Elsevier.
5. World Health Organization. (2011). Epidemiology and prevention of cardiovascular diseases in elderly people. *WHO Tech Rep Ser*, 853.
6. Alzheimer's Disease International. *Alzheimer's Disease International*. Recuperado Julio del 2012 de <http://www.alz.co.uk/research/statistics>
7. Nussbaum R., McInnes R., Willard H. (2007). *Genetics in Medicine* (pág. 22, 151). Canada: Elsevier Inc.
8. Church SL, Grant JW, Meese EU, Trent JM. (1992). Sublocalization of the gene encoding manganese superoxide dismutase (MnSOD/SOD2) to 6q25 by fluorescence in situ hybridization and somatic cell hybrid mapping. *Genomics*, 14: 823–825.
9. NCBI. Gene. *SOD2 superoxide dismutase 2, mitochondrial [Homo sapiens]*. Recuperado Junio del 2012 en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6648>
10. Galecki P, Śmigielski J, Florkowski A, Bobińska K, Pietras T, Szemraj J. (2010). Analysis of two polymorphisms of the manganese superoxide dismutase gene (Ile-58Thr and Ala-9Val) in patients with recurrent depressive disorder. *Psychiatry Research*, 179: 43-46

11. Visner GA, Dougall WC, Wilson JM, Burr IA, Nick HS, (1990). Regulation of manganese superoxide dismutase by lipopolysaccharide, interleukin-1, and tumor necrosis factor. Role in the acute inflammatory response. *The Journal of Biological Chemistry*, 265: 2856-2864.
12. NCBI. Gene. *CST3 cystatin C [Homo sapiens]*. Recuperado Junio del 2012 en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1471>
13. NCBI. Gene. *CTSD cathepsin D [Homo sapiens]*. Recuperado Junio del 2012 en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1509>
14. Chevallier N, Vizzavona J, Marambaud P, Baur CP, Spillantini M, Fulcrand P, Martinez J, Goedert M, Vincent JP, Checler F. (1997). Cathepsin D displays in vitro beta-secretase-like specificity. *Brain Res*, 750: 11-19
15. Borgstahl GE, Parge HE, Hickey MJ, Johnson MJ, Boissinot M, Hallewell RA, Lepock JR, Cabelli DE and Tainer JA. (1996). Human mitochondrial manganese superoxide dismutase polymorphic variant Ile58Thr reduces activity by destabilizing the tetrameric interface. *Biochemistry*, 35: 4287–4297.
16. Shimoda-Matsubayashi S, Matsumine H, Kobayashi T, Nakagawa-Hattori Y, Shimizu Y and Mizuno Y. (1996). Structural dimorphism in the mitochondrial targeting sequence in the human manganese superoxide dismutase gene. A predictive evidence for conformational change to influence mitochondrial transport and a study of allelic association in Parkinson's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 226: 561–565.
17. Lin C, Wang S, Wu C, Chuo L, Kuo Y. (2003). The Association of a Cystatin C Gene Polymorphism with Late-Onset Alzheimer's Disease and Vascular Dementia. *Chinese Journal of Physiology*, 46(3): 111-115
18. Mariani E, Seripa D, Ingegni T, Nocentini G, Mangialasche F, Ercolani S, Cherubini A, Metastasio A, Pilotto A, Senin U, Mecocci P. (2006). Interaction of CTSD and A2M

polymorphisms in the risk for Alzheimer's disease. *Journal of the Neurological Science*, 247: 187–191

19. Carrera C. (2008). *Estudio del polimorfismos Ile462Val del gen CYP1A1 en población ecuatoriana*. Tesis para obtención del título de Licenciada en Ciencias Biológicas. PUCE.
20. Mucke, L. (2009). Alzheimer's disease. *Nature Neuroscience*. Vol. 461
21. Chistyakov DA, Savost'anov KV, Zotova EV, Nosikov VV. (2000). Polymorphisms at the *SOD2* and *SOD3* Genes and Their Relation to Diabetic Neuropathy in Type 1 Diabetes Mellitus. *Pre-publication history*.
22. Wang V, Chen SY, Chuang TC, Shan DE, Soong BW, Kao MC. (2010). Val-9Ala and Ile+58Thr polymorphism of MnSOD in Parkinson's disease. *Elsevier Clinical Biochemistry*, 43: 979–982.
23. Nacmias B, Bagnoli S, Tedde A, Cellini E, Bessi V, Guarnieri B, Ortensi L, Piacentini S, Bracco L, Sorbi S. (2007). Angiotensin converting enzyme insertion/deletion polymorphism in sporadic and familial Alzheimer's disease and longevity. *ArchGerontolGeriatr*, 45(2): 201-6.
24. Maruyama H, Izumi Y, Oda M, Torii T, Morino H, Toji H, Sasaki K, Terasawa H, Nakamura S, Kawakami H. (2001). Lack of an association between cystatin C gene polymorphisms in Japanese patients with Alzheimer's disease. *Neurology*, 57: (2) 337–339.
25. Dodel RC, Du Y, Depboylu C, Kurz A, Eastwood B, Farlow M, Oertel WH, Muller U, Riemenschneider M. (2002). A polymorphism in the cystatin C promoter region is not associated with an increased risk of AD. *Neurology*, 58: (4) 664.
26. Roks G, Cruts M, Slooter AJ, Dermaut B, Hofman A, Van Broeckhoven C, Van Duijn CM. (2001). The cystatin C polymorphism is not associated with early onset Alzheimer's disease. *Neurology*, 57: (2) 366–367.
27. Jeong BH, Lee KH, Lee YJ, Yun J, Park YJ, Kim YH, Cho YS, Choi EK, Carp RI, Kim YS. (2011). Genetic polymorphism in exon 2 of cathepsin D is not associated with vascular dementia. *Acta Neurol Scand*, 123: 419–423.

Tabla 1. Resumen de los resultados obtenidos de los tres diferentes genotipos de cada polimorfismo y la distribución de los alelos de la población

Gen (polimorfismo)	Genotipo	# de casos	% en la población	Alelo	%
CST3 (G73A)^a	G/G	90	81.08%	G	85.14%
	G/A	9	8.11%	A	14.86%
	A/A	12	10.81%		
CTSD (C224T)^a	C/C	65	58.56%	C	77.03%
	C/T	41	36.94%	T	22.97%
	T/T	5	4.5%		
MnSOD (T58C)^a	T/T	111	100%	T	100%
	C/T	-	-	C	-
	C/C	-	-		
MnSOD (T9C)^a	T/T	21	18.92%	T	41.44%
	C/T	50	45.06%	C	58.56%
	C/C	40	36.02%		

Tabla 2. Análisis Hardy-Weinberg para los polimorfismos estudiados

Gen	Población	Genotipo	No. De individuos	%	Frecuencia Genotípica	Frecuencia esperada	Frecuencia alélica	HWE (P)
MnSOD T9C	Afectos	T/T	13	23.21	0.23	0.20	0.45	0.99 (0.32)
		T/C	24	42.86	0.43	0.49		
		C/C	19	33.93	0.34	0.31	0.55	
		Total	56					
	Controles	T/T	8	14.55	0.15	0.15	0.38	0.0001 (0.99)
		T/C	26	47.27	0.47	0.47		
		C/C	21	38.18	0.38	0.38	0.62	
		Total	55					
CST3 G73A	Afectos	G/G	42	75.00	0.75	0.65	0.80	24.44 (0.00001)
		G/A	6	10.71	0.11	0.32		
		A/A	8	14.29	0.14	0.04	0.20	
		Total	56					
	Controles	G/G	48	87.27	0.87	0.81	0.90	26.72 (0.00001)
		G/A	3	5.45	0.05	0.18		
		A/A	4	7.27	0.07	0.01	0.10	
		Total	55					
CTSD C224T	Afectos	C/C	20	35.71	0.36	0.41	0.64	3.35 (0.07)
		C/T	32	57.14	0.57	0.46		
		T/T	4	7.14	0.07	0.13	0.36	
		Total	56					
	Controles	C/C	45	81.82	0.82	0.81	0.90	0.45 (0.5)
		C/T	9	16.36	0.16	0.18		
		T/T	1	1.82	0.02	0.01	0.10	
		Total	55					

Tabla 3. Análisis de chi-cuadrado para los diferentes genes estudiados con sus respectivos polimorfismos.

Gen					X²	p
	Genotipo	T/T	T/C	C/C		
MnSOD T9C	Afectos	13	24	19	0.57 ^{NS}	0.45
	Controles	8	26	21		
	Genotipo	G/G	G/A	A/A		
CST3 G73A	Afectos	42	6	8	51.27*	0.00001
	Controles	48	3	4		
	Genotipo	C/C	C/T	T/T		
CTSD C224T	Afectos	20	32	4	0.21 ^{NS}	0.65
	Controles	45	9	1		

Valores calculados con 1 grado de libertad, *: significativo, ^{NS}: no significativo

Tabla 4. Análisis de Odds ratio para los tres polimorfismos

Gen	Genotipo	Afectos N(%)	Controles N(%)	OR ^a	95% IC ^b	P
MnSOD T9C	T/T	13 (23.2)	8 (14.5)	1 ^r		
	T/C	24 (42.9)	26 (47.3)	0.6	0.2 - 1.6	0.42 ^{NS}
	C/C	19 (33.9)	21 (38.2)	0.6	0.2 - 1.6	0.42 ^{NS}
	T/C + C/C	43 (76.8)	47 (85.5)	0.6	0.2 - 1.5	0.36 ^{NS}
CST3 G73A	G/G	42 (75.0)	48 (87.3)	1 ^r		
	G/A	6 (10.7)	3 (5.5)	2.3	0.5 - 9.7	0.43 ^{NS}
	A/A	8 (14.3)	4 (7.3)	2.3	0.6 - 8.1	0.32 ^{NS}
	G/A + A/A	14 (25.0)	7 (12.8)	2.3	0.8 - 6.2	0.16 ^{NS}
CTSD C224T	C/C	20 (35.7)	45 (81.8)	1 ^r		
	C/T	32 (57.1)	9 (16.4)	8.0	3.2 - 19.8	0.0001*
	T/T	4 (7.1)	1 (1.8)	9.0	0.9 - 85.7	0.025*
	C/T + T/T	36 (64.2)	10 (18.2)	8.1	3.4 - 19.5	0.0001*

*: significativo, ^{NS}: no significativo, ^a: odds ratio, ^b: intervalos de confianza, ^r: referencia

Figura 1. Resultados de la secuenciación capilar del polimorfismo *Ile-58Thr* del gen MnSOD

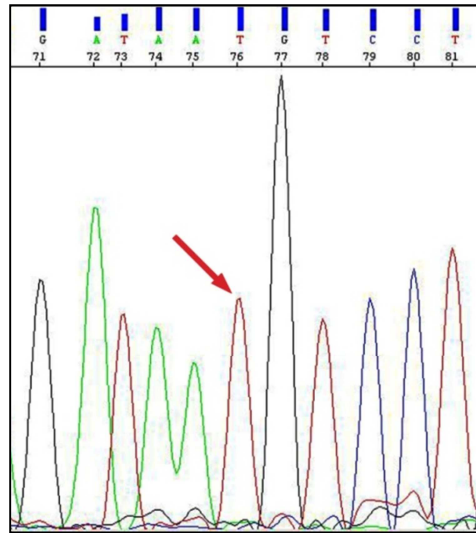
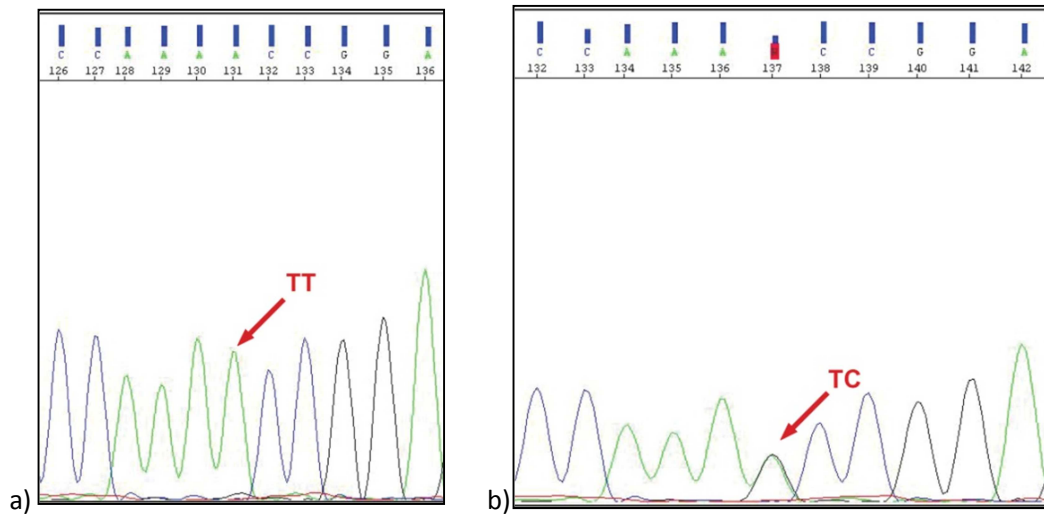


Figura1. Representación del genotipo homocigoto normal TT de la variante polimórfica en la secuencia de ADN.

Figura 2. Resultados de la secuenciación capilar del polimorfismo *Ala-9Val* del gen MnSOD



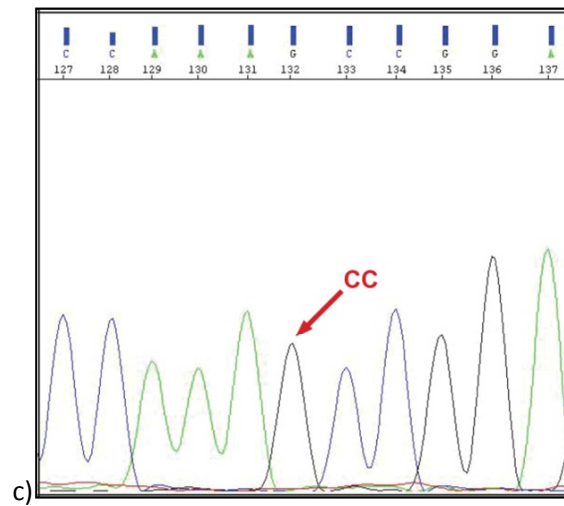


Figura 2. Representación gráfica de: a) genotipo normal T/T, b) genotipo heterocigoto T/C y c) genotipo normal C/C de la secuenciación capilar de MnSOD (Ala-9Val).

Figura 3. Agrupamiento de muestras secuenciadas del polimorfismo *Ala-9Val* del gen MnSOD con la secuencia del gen en SeqScope.



El software SeqScope, muestra de una manera más rápida la ubicación del polimorfismo en análisis, conjuntamente con la cadena madre del gen MnSOD ubicada en la parte superior. Se pueden realizar varios análisis al mismo tiempo y determinar así el genotipo de cada muestra.

Figura 4. Resultados de la restricción con la enzima *EagI*

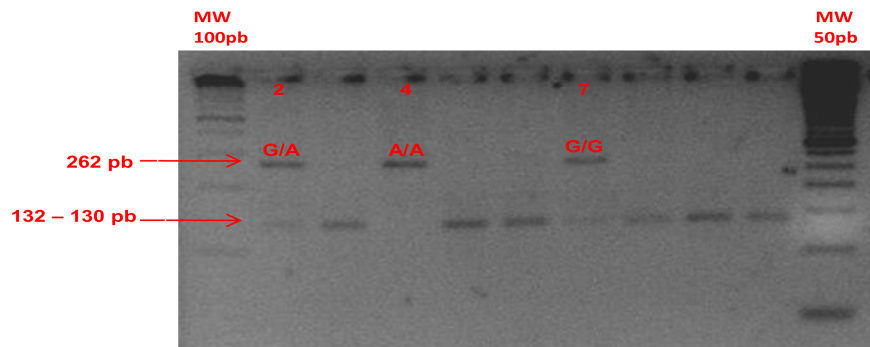


Figura 4. Resultados de la restricción con la enzima *EagI*. Revelación en gel de agarosa al 4%, correspondiente al gen CST3. El primer y último pocillo corresponde a ladders de 100 y 50 pares de bases respectivamente. Las bandas del segundo pocillo muestran ser del genotipo heterocigoto GA, del cuarto pocillo al genotipo homocigoto raro AA y el séptimo pocillo al genotipo homocigoto normal GG.

Figura 5. Resultados de la restricción con la enzima *AciI*

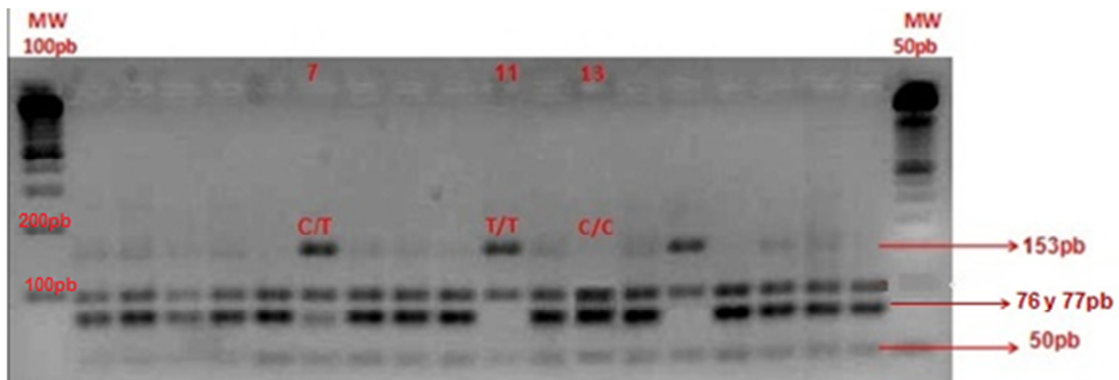


Figura 5. Resultados de la restricción con la enzima *AciI*. Revelación en gel de agarosa al 4%, correspondiente al gen CTSD. El primer y último pocillo corresponde a los marcadores de peso molecular de 100 y 50 pares de bases respectivamente. Las bandas del séptimo pocillo muestran ser del genotipo heterocigoto CT, del onceavo pocillo al genotipo homocigoto raro TT y el decimoquinto pocillo al genotipo homocigoto normal CC.